氮添加对樟子松人工林氮转化及相关功能基因丰度的影响

刘鑫军[1]，魏洪杰[2]

（1. 河北政法职业学院 生态工程系，石家庄，050061；2. 石家庄市城市水系园林中心，石家庄，050061）

摘 要：土壤氮（N）的有效性是影响土壤微生物群落结构以及土壤氮循环的重要因子，但关于N添加对樟子松人工林土壤N转化及N功能基因（NFGs）表达的影响却知之甚少。为探索N添加对樟子松人工林氮素转化的影响及其作用机制，该文以塞罕坝千层板林场的樟子松人工林为研究对象，进行了2年的氮添加处理，设置4个不同氮添加水平0、1、5、10 gN m^{-2} • $year^{-1}$，分别记作N0、N1、N5、N10，采用功能基因微阵GeoChip 5.0系统及室内土壤培养法，探讨了土壤NFGs对氮添加的反应及其对氮转化过程的影响。结果表明，（1）与N0相比，中低N添加处理（N1、N5）促进了氨化（*ureC*、*nirA*、*nrfA*）、硝化（*amoA*）和反硝化（*norB*）相关基因的相对丰度，高N处理（N10）则抑制了所有NFGs的表达。（2）相关分析表明，N1、N5的促进作用与土壤有机碳(SOC)、硝态氮(NO_3^--N)和微生物生物量碳(MBC)显著相关，N10处理显著降低了所有氮转化过程NFGs的相对丰度，这种负面影响与溶解性有机碳(DOC)、MBC含量的减少有关。（3）与氮转化基因丰度规律趋势相似，N1和N5处理显著增加了净N硝化、净N矿化以及N_2O的排放速率，但N10促进作用不明显，表明氮添加对氮转化的促进作用存在阈值。（4）多元回归分析进一步表明*amoA-AOB*和MBC是影响净N硝化的关键因素，*ureC*、*nirK*和MBC是影响净氮矿化的关键因素，*narG*、*nirS*是影响N_2O排放的关键因素。综上，N添加可提高促进樟子松人工林的氮转化及提高部分特定酶功能基因的相对丰度，但氮添加水平存在阈值，当施用10 g N m^{-2} • $year^{-1}$时，氮转化受到抑制，添加5gN m^{-2} • $year^{-1}$是促进樟子松人工林土壤N转化的较佳水平。

关键词：氮添加，氮功能基因（NFGs），净氮转化，N_2O排放

Effects of nitrogen addition on nitrogen transformation and related functional gene abundance in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation

LIU Xinjun[1], WEI Hongjie[2]

（1. *Department of Ecological Engineering of Hebei Professional College of Political Science and Law*, Shijiazhuang 050061, China; 2 *Shijiazhuang Municipal*

基金项目：河北省自然科学基金项目（HB15JY034） [Supported by theNatural Science Foundation Project of Hebei (HB15JY034)]。

第一作者：刘鑫军(1972-)，硕士，副教授，主要从事园林栽培、园林规划教学与研究、高职教育理论研究。(E-mail) lxjwhj @126.com。

Water System Garden Center, Shijiazhuang 050061, China）

Abstract: Soil nitrogen (N) effectiveness is an important factor affecting soil microbial community structure and soil N cycling, however, little is known about the effect of adding N on soil N transformation and N functional gene (NFGs) expression in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation. In order to explore the effect of N addition on nitrogen transformation in Pinus sylvestris plantation and its mechanis, In this work, 2 years nitrogen addition of the *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation in the Saihanba Melaleuca Forest Farm were added four different N levels of 0, 1, 5, and 10 gN $m^{-2}\cdot year^{-1}$, which were designated with N0, N1, N5, and N10, and with the GeoChip 5.0 functional gene microarray system and the greenhouse soil culture method, the response of soil NFGs to N addition and its influence on N transformation processes were discussed. The results were as follows: (1) The N1 and N5 treatments significantly affect the ammonification (*ureC*, *nirA*, *nrfA*), nitrification (*amoA*) and denitrification (*norB*) and compared with the N0 treatment, N10 treatment reduces the expression of all NFGs. (2) Correlation analysis showed that the above promotion was significantly associated with soil organic carbon(SOC), nitrate nitrogen(NO_3^--N) and microbial biomass carbon(MBC), and N10 treatment significantly reduced the relative abundance of NFGs for all N transformation processes, and this negative effect was associated with a reduction in dissolved organic carbon(DOC) and MBC content. (3) Similar to the trend of nitrogen transformation gene abundance, N1 and N5 treatments significantly increased net N nitrification, net N mineralization and N_2O emission rate, but the promotion of N10 was not significantly, and there was a threshold for the promotion of nitrogen conversion by nitrogen addition. (4) Furthermore, multiple regression analysis further showed that *amoA-AOB* and MBC were key factors affecting net N nitrification, *ureC*, *nirK* and MBC were key factors affecting net N mineralization, and *narG* and *nirS* were key factors affecting N_2O emissions. In a nutshell, N addition can improve the promotion of N transformation and increase the relative abundance of some specific enzyme functional genes in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation, but there is a threshold value for N addition level, when 10 gN m^{-2} • $year^{-1}$ was applied, N transformation was inhibited, and 5gN m^{-2} •$year^{-1}$ was a better level to promote soil N transformation in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation.

Key words: Nitrogen addition, nitrogen functional genes(NFGs), net nitrogen transformation, N2O emissions

土壤氮(N)的有效性是影响陆地生态系统中植物生长和土壤生物化学的重要因素(巨晓棠，2014)。全球 N 沉降正在改变土壤 N 有效性及影响着生态系统土壤的 N 循环(廖珂等，2021；吴玉凤等，2019)，包括 N 矿化、硝化以及 N_2O 排放，这可能导致陆地 N 供需失衡、面源污染以及温室气体排放等环境问题(李海霞等，2021)。土壤微生物作用被认为是影响 N 循环过程的主要驱动力，但关于 N 循环的微生物作用核心过程对 N 沉降的响应以及与 N 转化的关系知之甚少。

氮功能基因（nitrogen function genes，NFGs）可直接编码关键酶从而影响氮循环过程，是表征氮生物转化功能的直接指标(廖李容等，2019)。以往关于 NFGs 的研究主要集中于农业生态系统和亚热带森林系统。在农业生态系统中，研究发现施氮对 N 固定基因（*nifH*）丰度没有明显影响，但增加了硝化基因（*amoA*）和反硝化基因（*nirK*、*nirS*、*nosZ*）的相对丰度，其主要受氮形态和土壤 pH 调控(Ouyang et al., 2018)。而在亚热带森林土壤中，N 添加降低了 *nifH* 等 N 固定基因和 *amoA* 等反硝化基因丰度，而增加了反硝化基因丰度(Tian et al., 2019)。与亚热带森林和农业土壤相比，北方寒温带森林土壤养分相对贫乏、氮输入低、降水量少以及温度波动较大(Tian et al., 2019)，因此可能形成不同的微生物群落结构从而对氮转化的影响存在差异。然而，目前关于氮添加对寒温带森林土壤 NFGs 的影响鲜有报道。

近几十年来，国内外学者在森林生态系统氮的转化方面进行了一系列研究，初步揭示了氮添加情况下非生物和生物因素对特定氮转化过程（即硝化、矿化和 N_2O 排放）的驱动机制(Chelsea et al., 2016)。在所有的 NFGs 中，影响硝化限速步骤的 *amoA* 基因、影响反硝化第一步的 *narG* 基因以及影响限速步骤的 *nir* 基因通常被认为是控制 N 转化的枢纽因子(Ouyang et al., 2018；Chelsea et al., 2016)，且发现土壤有效磷、pH 以及溶解性氮是影响 NFGs 丰度的主要因素(Wang et al., 2017)。表明土壤性质和微生物功能在氮素转化中起着重要作用，即外源氮添加可直接影响土壤性质、微生物群落结构，并对氮转化过程产生深远影响(Wang et al., 2017)。但二者在多大程度上作用于氮素转化过程，以及影响氮素转化的主导因素尚不清楚。因此 N 添加能否介导土壤 NFGs 表达，从而影响相关 N 转化过程?土壤 N 转化过程与 NFGs、土壤性质三者间的相关关系如何?这些问题都严重制约着人们对樟树人工林土壤氮转化及其影响作用机制的认识。本研究以河北省塞罕坝樟子松人造林为研究对象，采用功能基因微阵 GeoChip 5.0 系统及室内土壤培养法，通过分析不同氮添加水平对土壤性质、NFGs 及其氮转化过程参数的影响，拟探讨不同氮添加水平条件下 NFGs 和土壤性质对樟子松人工林氮素转化的相对贡献以及影响相关氮素转化过程的关键因素，以期为樟子松人工林的氮肥管理提供依据。

1　材料和方法

1.1 研究区概况

研究区地处大兴安岭山系与冀北山地交汇处，位于河北省围场满族蒙古族自治县北部的塞罕坝机械林场千层板林场内（17°39′42″E，42°35′45″N）。该林场于 1962 年建成，人工林面积 20 029.8 hm^2，是我国樟子松种群的主要人造林区，林分密度 1 300～1 600 株，该人工林自建成以来每 8—10 年进行一次采伐及补种。该区域属温带大陆性半干旱半湿润气候区，全年气候冬季漫长，低温寒冷，春秋季短暂，干燥多风，该区域的平均环境氮沉降水平为 3.34 g N m^{-2} • year^{-1}。试验

区海拔高度 1 432 m，年均降水量 454.2 mm，年均日照时数 2 368.8 h，年均蒸发量 1 244.9 mm，年均相对湿度 75.3%，年均气温-1.4 ℃。土壤类型主要为风沙土，主要成土母质为风积物、残积物、堆积物。林下灌木、草本稀疏，以瓣蕊唐松草（*Thalictrum petaloideum*）、腺毛委陵菜（*Potentilla longifolia*）、地榆（*Sanguisorba officinalis*）、大披针薹草（*Carex lanceolata*）为主。

1.2 样地设置与样品采集

2018 年 3 月选择树苗年限为 12 年的样点，设置 4 个氮素处理，每个处理 4 个重复，共 16 个小区，小区面积均为 6 m×6 m，小区之间设置 4 m 的缓冲带。氮素以硝酸铵（NH_4NO_3）溶液的形式在四个氮水平下添加：0(N0)，1(N1)，5(N5)和 10(N10) g N m^{-2} • $year^{-1}$，与该地的自然氮沉降速率(3.34 g N m^{-2} • $year^{-1}$)相比，N1，N5 和 N10 处理分别代表了低，中和高氮沉降量。每次施用将对应 NH_4NO_3 稀释于 10 L 蒸馏水中，在 2018 年 6 月至 2020 年 6 月隔两个月施氮一次，施用时间均为月初早上约 10:30，并保证该施用时间前后 15 h 无下雨情况，试验期间共施 12 次。对于 N0 处理，采用等体积的蒸馏水喷洒样地，施用时间及方式与氮素添加处理相同。

2020 年 6 月 20 日（晴天），使用不锈钢土壤螺旋钻（长 20 cm，直径 6 cm）从表土（0～20 cm）收集土壤样本，取样前去除表层凋落物，在每个样地随机选取 5 个取土点土壤汇集成一个样本，保存于无菌聚乙烯袋中，将样品快速储存含干冰的泡沫箱，并快速运送到实验室。所有土壤样本去除残根、凋落物和砾石后分为 3 部分：一部分保存于 4 ℃，用于测定微生物生物量和溶解营养物以及培养实验；另一部分样品风干后进行土壤基础理化分析；最后部分立即保存于-80 °C 环境采用功能基因微阵 GeoChip 5.0 系统定量分析土壤 NFGs 相对丰度。

1.3 样品分析

1.3.1 土壤样品理化性质测定

土壤样品理化性质测定参照鲍士旦(2000)所述测定。土壤 pH 值测定：称取 10.00 g 风干土壤于 50 mL 烧杯中，加入蒸馏水（水:土=2.5:1），间歇搅拌 30 min，静置 15 min 后采用奥豪斯 ST3100/F 型 pH 计进行酸碱值测定。土壤有机碳(soil organic carbon，SOC)测定：称取过 0.149 mm 筛孔的风干土 0.5000 g 放入 150 mL 三角瓶中，加入粉末状 $AgNO_3$ 0.10 g，接着精确加入 0.8 mol • L^{-1} 重铬酸钾（$K_2Cr_2O_7$）溶液和浓硫酸各 5 mL，瓶口加盖小漏斗，放置于 230 ℃电砂浴中加热 15 min，采用 0.1 mol •L^{-1} 的硫酸亚铁溶液还原滴定法测定 SOC 含量。总氮(total nitrogen，TN)测定：称取 0.5000g 风干土壤放入凯氏瓶中，加入适量蒸馏水湿润样品，加入 8 mL 浓硫酸，在通风橱中消解至淡蓝色，采用全自动凯氏定氮仪(KDN-520，杭州绿博仪器有限公司)测定。全磷（TP）测定：称取 0.25g 风干土壤于镍坩埚，加入 3 滴无水乙醇，在样品上平铺 2 g NaOH，将坩埚放入高温电炉 400 ℃、15 min，采用 75 ℃蒸馏水洗涤坩埚并转移至 100 mL 容量瓶中，吸

取消化的母液 5 mL 至 50 mL 容量瓶中，加入蒸馏水稀释至 30 mL，加入二硝基酚 3 滴，加入钼锑抗显色剂 5 mL，定容至刻度，采用紫外分光光度计（T-6M，上海菲勒仪器有限公司）在 700 nm 处测定。有效磷(available phosphorus，AP)的测定：称取 0.25 g 风干土样于 200 mL 带瓶盖的塑料瓶中，加入 50 mL 的 0.5 mol·L^{-1} $NaHCO_3$，恒温(25 ℃)振荡浸提 30 min，采用无磷滤纸过滤，吸取滤液 5 mL 并加入钼酸铵使用液 5 mL 和氯化亚锡试剂 1 滴，显色 15 min 后借助紫外分光光度计在 680 nm 处测定。土壤铵态氮(NH_4^+-N)和硝态氮(NO_3^--N)测定：称取 5.00 g 风干土放入离心管中，加入 25 mL、2 mol·L^{-1} 的 KCl 振荡浸提（120 r·min^{-1}、2h），振荡结束后高速离心 8 000 r·min^{-1}、15 min，静置后过滤，取两份滤液，一份加入盐酸-乙二胺四乙酸二钠缓冲液用于测定 NO_3^--N，另一份加入苯酚钠-乙二胺四乙酸二钠缓冲液用于测定 NH_4^+-N，二者皆采用连续流动分析仪（SmartChem 200，AMS/Alliance, Italy）测定。溶解性有机碳(dissolved organic carbon，DOC)测定：称取 20.0 g 风干土样于带盖的 150 mL 塑料瓶中，加入 60 mL、5 g·L^{-1} 偏磷酸钠，以转速为 120 r·min^{-1} 往复振荡 18 h，振荡悬浮物放置于 60℃ 环境下烘干 48 h，借助 TOC 自动分析仪（TOC-LCPH，Shimadzu，Japan）测定 DOC。总溶解性氮(total dissolved nitrogen，TDN)测定：称取 5.00 g 风干土于 50 mL 带盖的塑料瓶中，加入 25 mL、1 mol·L^{-1} 氯化钾溶液，以转速为 180 r·min^{-1}，往复振荡 1 h，振荡悬浮物静置 10 min 后过滤于 50 mL 容量瓶中，取 8 mL 滤液加入 10 mL 过硫酸钾氧化剂氧化 15 min，采用连续流动自动分析仪测定 TDN 浓度。溶解性有机氮(dissolved organic nitrogen，DON)以 TDN — (NH_4^+-N + NO_3^--N)计算(吉恒宽等，2020)。称取 40%田间持水量的新鲜土壤 70.0 g 于 80 mL 的烧杯中，将烧杯放入真空干燥器中，同时放入装满氯仿的同规格烧杯，采用熏蒸抽真空装置抽为真空状态，在-0.07 MPa 真空下使氯仿剧烈沸腾 5min，重复该步骤直至氯仿熏蒸完全；将熏蒸土壤转移至塑料瓶中，加入 100 mL、0.5 mol·L^{-1} 硫酸钾溶液振荡（25 ℃、300 r·min^{-1}）浸提 30 min，悬浮物过滤，取两份 10 mL 滤液，一份加入 10 mL 六偏磷酸钠溶液用于测定微生物生物量碳(microbial biomass carbon，MBC)，另一份置于消煮管中，加入 5 mL 浓硫酸消化、回流 3 h 用于测定微生物生物量氮(microbial biomass nitrogen，MBN)，二者均采用 TOC 自动分析仪测定。

1.3.2 土壤净氮转化和 N_2O 排放速率测定

净氮转化分为净氮硝化速率（*Rn*）和净氮矿化速率（*Rm*），皆通过培养 14 d 的土壤样品测定。简而言之，每个样本采用 40.00 g 土壤放置于 500 mL 的聚乙烯瓶（高 8 cm，直径 6 cm）中，保持 60%的土壤含水率，在 25℃的恒温黑暗培养箱中预培养 6 d，然后，在相同的环境条件下正式培养 14 d。在培养的第 1、7、14 d 分别对培养瓶进行土壤取样，测定样品无机氮浓度。*Rn* 和 *Rm*(mg N kg^{-1}·d^{-1})计算参照王子龙(2021)的方法，*Rn*(mg N kg^{-1}·d^{-1})=培养后硝态氮(NO_3^--N)含量 - 培养前硝态氮(NO_3^--N)含量/培养时间。*Rm*(mg N kg^{-1}·d^{-1})=培养后无机氮（NH_4^+-N

+ NO_3^--N）含量 - 培养前无机氮（NH_4^+-N + NO_3^--N）含量/培养时间。

通过平行培养实验测定 N_2O 排放速率。所有的聚乙烯瓶都覆盖一层无菌透气的有机膜，以防止水分流失和保持通气。使用 Picarro G2508 型气体浓度分析仪(Picarro G2208 Environment, Picarro Inc., CA, USA)在培养期的第 1、3、5、7 和 14 d 测定 N_2O 排放速率(马芬等，2015)。在测量 N_2O 排放速率前密封乙烯培养罐 12 h，N_2O 排放速率($\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)通过 12 h 密闭期中 N_2O 浓度的变化计算。

1.3.3 土壤微生物 NFGs 功能基因测定

利用 GeoChip 5.0 功能微阵列系统对微生物 NFGs 的综合序列进行测定分析，该系统是一个分析微生物群落功能基因的高通量平台。GeoChip 5.0 包含 N57000 个寡核苷酸探针，覆盖了 N373 基因家族中 144000 多个基因序列，可以检测比 qPCR 更广泛的基因类型，现已用于不同的微生物功能和生物地球化学过程(卢慧等，2018)。

将每个处理的土壤样品解冻后，称取 0.50 g 土壤样本中使用 PowerSoil 试剂盒(MoBio,Carlsbad,USA)进行 DNA 提取。各样点土壤取 3 组平行样品。DNA 纯度和数量分别使用分光光度计和截面读取系统(FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Jena, Germany)检测。将检测合格的 DNA 样品进行荧光标记、芯片杂交、芯片扫描与成像(Li et al., 2017)。基因芯片实验每组皆进行 3 次重复。

基因芯片具体步骤如下，采用 Cy-3 荧光染料随机引物标记，采用 QIA 纯化试剂盒(QIAGEN QUICK Purification Kit, Roche NimbleGen Inc, USA)纯化荧光标记后的 DNA，并将标记成功的 DNA 样品采用干燥旋转仪(Savant SVC200, Thermo Savant, Holbrook, NY, USA)在 45℃条件下干燥 45 min。接着在标记浓缩后的 DNA 样品加入 120 μL 杂交缓冲液（40%甲酰胺、0.1%十二烷基硫酸钠、10 μg 未标记的 DNA、2×SSC），待完全溶解后 90 ℃变性 5 min，50 ℃保存 30 min，在 MAUI 杂交平台 40 ℃进行杂交 16 h。采用 NimbleGen MS200 微阵列扫描仪(Roche NimbleGen, Inc., Madison, WI, USA)对杂交后的芯片在 633 nm 上扫描微阵列。扫描得到的图像由 Imagene6.0 软件对扫描图像进行转换、提取及信号强度标准化。

数据的标准化处理包括片间归一化和去假阳性。把各个样本光强总和调整为同一批次光强最高样本水平。去除信噪比小于 2.0 的低质量点。将将信号值标准化，最后转化为自然对数数字信息(Zhang et al., 2017)。上述 NFGs 功能基因分析委托上海派森诺生物科技有限公司完成。

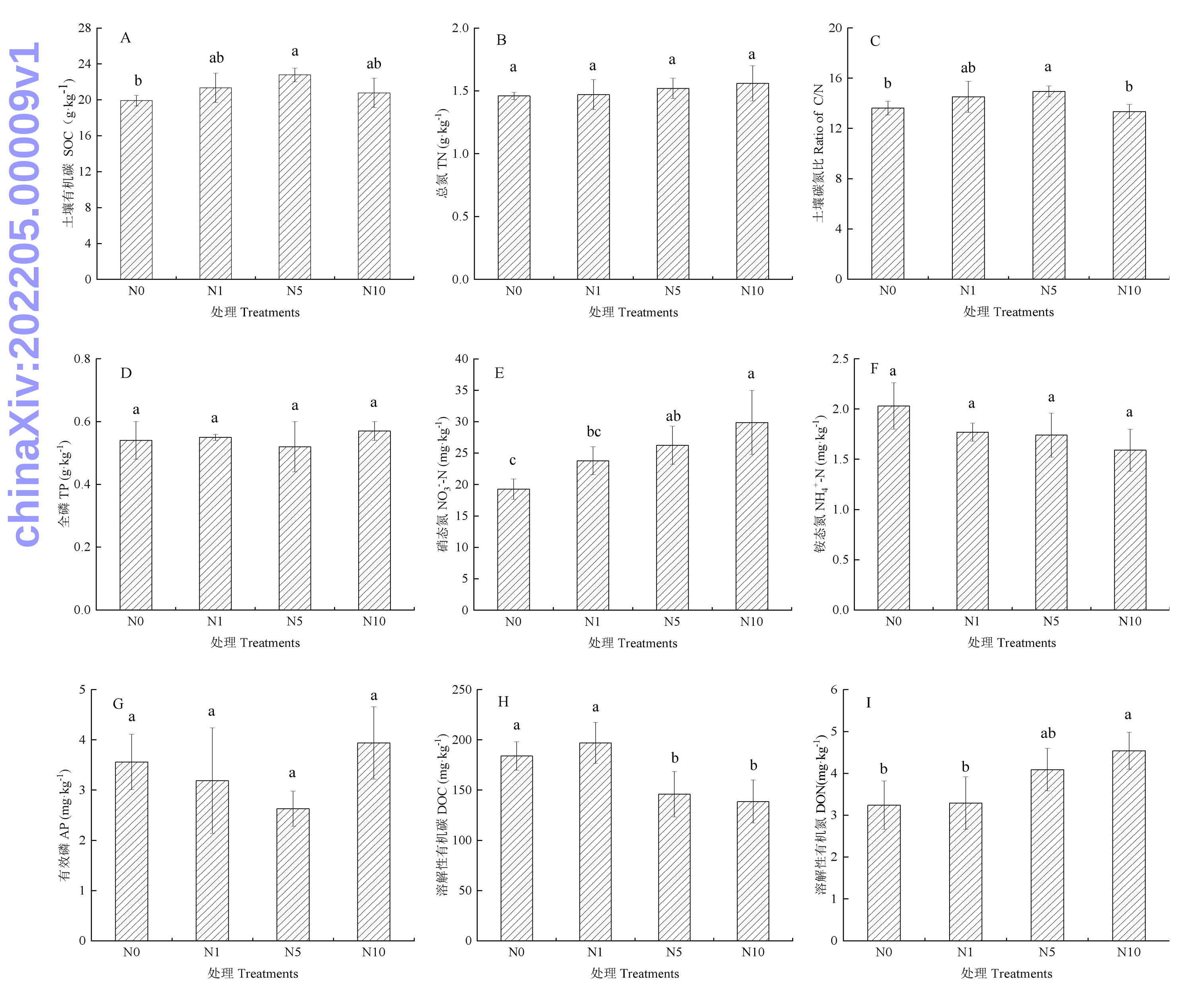
1.4 数据处理

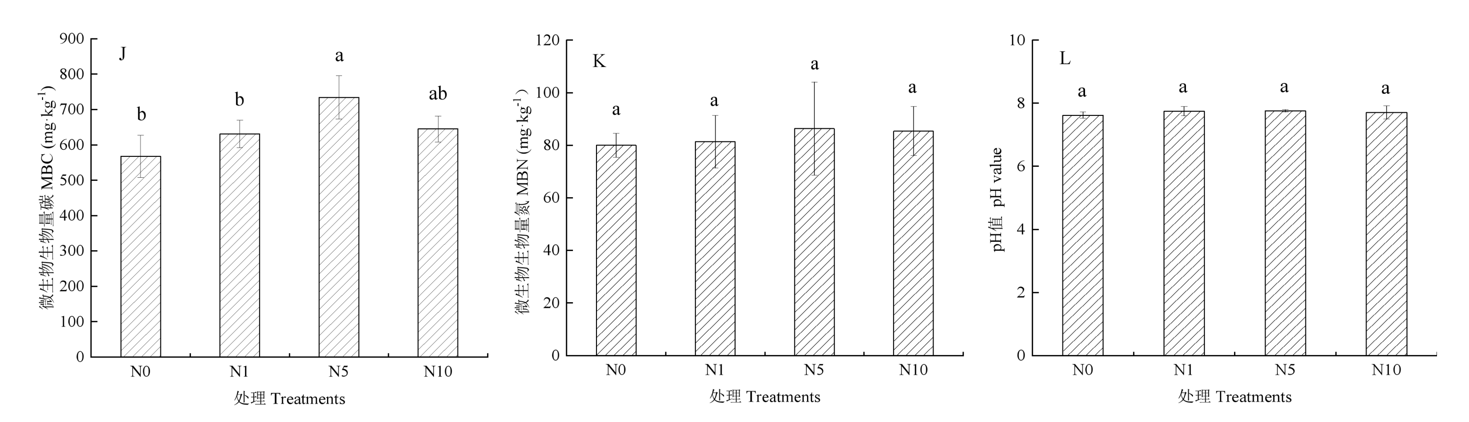
使用 IBM SPSS 22.0 单因素方差分析(One-way, ANOVA)和 Tukeytest 多重比较检验评价氮添加对土壤性状、基因相对丰度、NFGs 氮素转化率的影响，利用 Pearson 相关分析检验土壤性质、NFGs 丰度与氮素转化速率之间的关系；采用 Origin 8.5 绘制图形。所有结果均为 4 个重复的平均数±标准差（Mean±SD）。

2　结果与分析

2.1 氮添加对樟子松人工林土壤理化性质的影响

从图 1 可知，连续两年的 N 添加显著改变了部分土壤的理化性质。从单个土壤指标来看，土壤 NO_3^--N 和 DON 浓度随着 N 添加水平的增加而增加，皆以 N10 处理值最大，且显著大于 N0 处理（P<0.05）。随着氮添加水平的提高土壤 NH_4^+-N 含量呈下降趋势，但各处理间均无显著差异。SOC、MBC 以及 C/N 随着 N 添加水平的增加呈先上升后下降的趋势，同时皆表现为 N5 处理具有最大值；DOC 含量随着 N 添加水平的提高亦呈降低趋势，以 N1 处理值最大。其他土壤性质中，各处理的 MBN、TN、TP、AP 和 pH 差距较小，处理间皆均无显著差异。





注：不同小写字母表示不同处理间差异达 0.05 显著水平。下同。

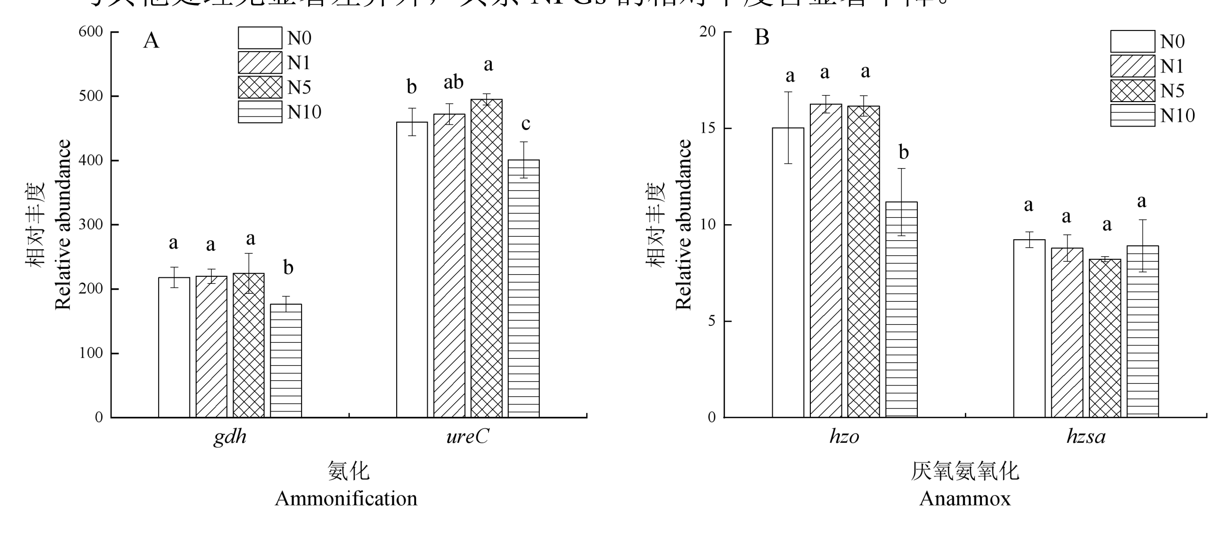
Note:Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments($P<0.05$). The same below.

图 1 氮添加对樟子松人工林土壤理化性质的影响

Fig. 1 Effects of nitrogen addition on soil physical and chemical properties of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation

2.2 氮添加对樟子松人工林氮功能基因（NFGs）相对丰度的影响

从图 2 可知，N 的添加显著改变了部分 NFGs 的相对丰度。就单个 NFG 基因的相对丰度来看，N 养分固定基因（*nifH*）和反硝化基因（*narG*）是 NFGs 丰度值最大的两个基因，分别占总丰度的 16.69%～18.03%和 17.42%～18.98%。同时，较未施氮处理（N0）相比，N1 处理显著增加了参与硝化过程的 *amoA-AOA* 和 *amoA-AOB* 基因（编码单氧化铵酶）、参与反硝化作用的 *norB* 基因（编码亚硝酸还原酶）、参与同化氮还原的 *nirA* 基因（编码硝酸还原酶）、参与异化氮还原的 *nrfA* 基因（编码硝酸还原酶辅酶Ⅱ）的相对丰度；N5 处理显著增加了参与氨化的 *ureC* 基因（编码脲酶）、*amoA-AOB*、*norB*、*nirA* 以及 *nrfA* 的相对丰度。同样地，N10 处理中，除了参与氨氧化物的 *hzsa* 基因（编码谷氨酸合酶）与其他处理无显著差异外，其余 NFGs 的相对丰度皆显著下降。



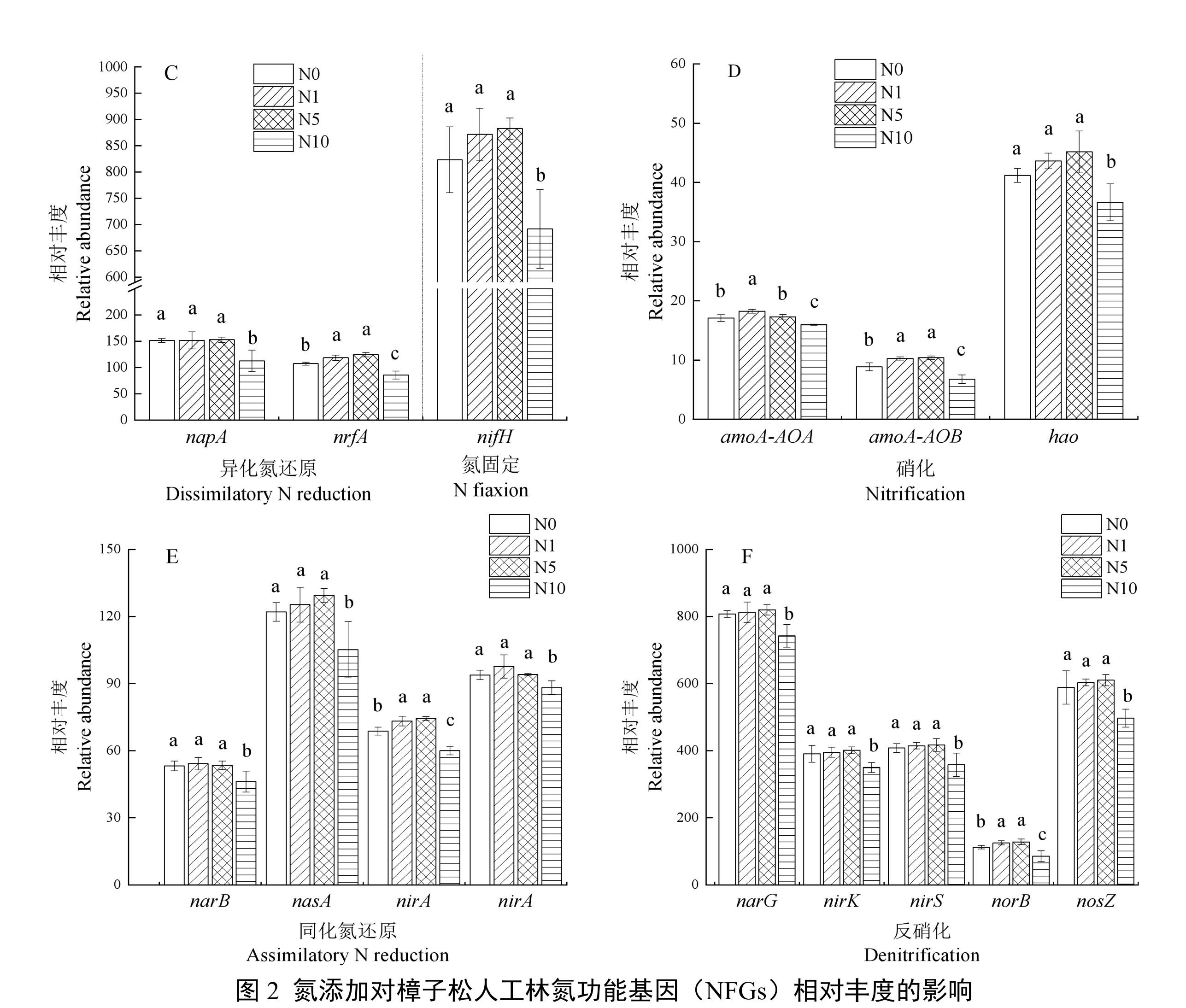


图 2 氮添加对樟子松人工林氮功能基因（NFGs）相对丰度的影响

Fig. 2 Effects of nitrogen addition on the relative abundance of nitrogen functional genes (NFGs) in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation

2.3 氮添加对樟子松人工林氮素转化过程 NFGs 总丰度的影响

由图 3 可知，就各氮素转化过程的 NFGs 总相对丰度来看，微生物对氮素反硝化、固氮、氨化的过程影响最大，三者丰度总和占总 NFGs 丰度的 73.7%以上。就试验处理丰度值来看，在反硝化、固氮、氨化、厌氧氨氧化、硝化、同化氮还原及异化氮还原 7 个氮素转化过程中，除厌氧氨氧化的 N10 与 N0 无显著差异外，其它各过程皆以 N10 处理显著小于其他处理，且各处理氮素转化过程呈 N5＞N1＞N0＞N10 的趋势，且 N0 与 N1 之间均无显著差异。

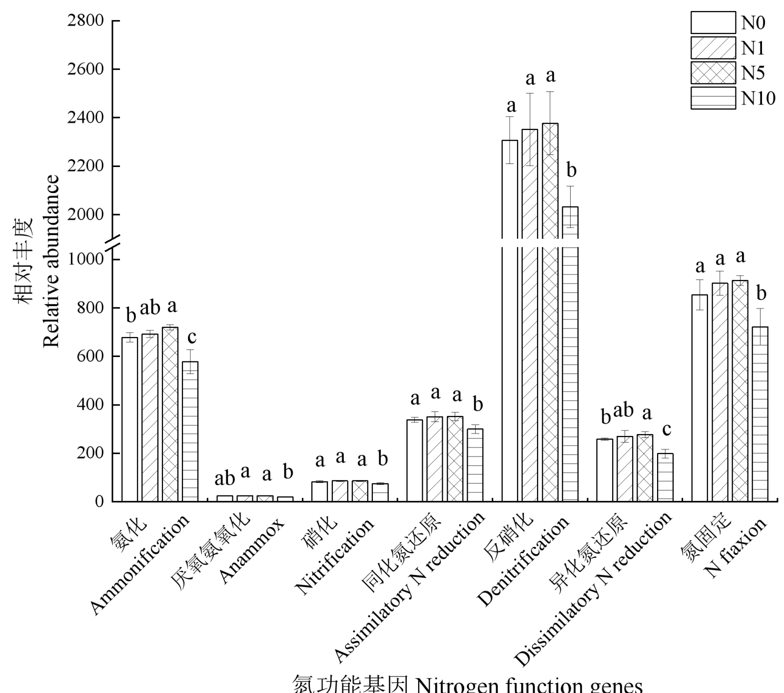


图 3 氮添加对樟子松人工林各氮转化过程 NFGs 相对丰度的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen addition on the relative abundance of NFGs in each nitrogen transformation process of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation

2.4 氮添加对樟子松人工林 土壤净 N 硝化速率、净 N 矿化和 N_2O 排放速率的影响

由表 1 可知，与 N0 处理相比，两年的氮添加显著增加了 N1 和 N5 净 N 硝化、净 N 矿化和 N_2O 的排放速率，三者在 N5 处理时达到最大值，之后在 N10 处理时下降，N10 处理与 N0 处理均没有显著差异。与 N0 处理相比，添加氮后净 N 硝化、矿化和 N_2O 的排放速率均得到不程度的提高，净 N 硝化率、矿化和 N_2O 排放速率在加入氮后分别增加了 18.62%～57.41%、10.95%～49.88%和 1.69%～28.55%。

表 1 氮添加对樟子松人工林土壤净 N 硝化、净 N 矿化和 N_2O 排放速率的影响

Table 1 Effects of nitrogen addition on soil net N nitrification rate, net N mineralization rate and N_2O emission rate in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation

处理 Treatments	净氮硝化速率 Net N nitrification rate (mg N·kg^{-1}·d^{-1})	净氮矿化率 Net N mineralization rate (mg N·kg^{-1}·d^{-1})	N_2O 的排放率 N_2O emission rates (μg N·kg^{-1}·d^{-1})
N0	0.32±0.05c	0.42±0.05b	5.04±0.34c
N1	0.42±0.04ab	0.54±0.04a	5.64±0.13ab
N5	0.47±0.03a	0.59±0.05a	6.06±0.29a
N10	0.38±0.03bc	0.46±0.02b	5.27±0.41bc

注：不同小写字母表示不同处理间差异达 0.05 显著水平。

Note:Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ($P<0.05$).

2.5 氮添加下樟子松人工林土壤氮转化NFGs丰度与土壤因子的相关分析

从表 2 可知，12 个土壤理化性质指标与固氮、氨化、硝化、反硝化等 7 个氮素转化指标的相关分析中，土壤因子 TN、TP、NO_3^--N、DOC 中与某一氮转化过程 NFGs 丰度存在显著相关性，其余土壤因子与其任一氮转化过程 NFGs 丰度皆不存在明显的相关关系。就 TN 而言，TN 与硝化、同化氮还原、异化氮还原过程指标均呈显著正相关。TP 与异化氮还原 NFGs 丰度表现出显著正相关关系。在 NO_3^--N 与 DOC 的土壤指标中，DOC 与固氮、氨化、反硝化、同化氮还原、异化氮还原表现为显著的正相关关系，NO_3^--N 与固氮、氨化、硝化、反硝化、同化氮还原、异化氮还原、厌氧氨氧化的 NFGs 丰度皆表现为显著的正相关关系。

表 2 氮添加下樟子松人工林土壤氮转化功能基因丰度与土壤因子的相关分析

Table 2 Correlation analysis of soil nitrogen transformation process and soil factors in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* plantation under nitrogen addition

土壤因子 Soil factor	固氮基因丰度 N fiaxion gene abundance	氨化基因丰度 Ammonification gene abundance	硝化基因丰度 Nitrification gene abundance	反硝化基因丰度 Denitrification gene abundance	同化氮还原基因丰度 Assimilatory N reduction gene abundance	异化氮还原基因丰度 Dissimilatory N reduction gene abundance	厌氧氨氧化基因丰度 Anammox gene abundance	氮功能基因总丰度 Total abundance of nitrogen function genes
SOC	0.49	0.25	0.48	0.45	0.41	0.43	0.49	0.45
TN	0.24	0.47	0.81*	0.35	0.83*	0.77*	0.24	0.33
C/N	0.44	0.50	0.46	0.43	0.40	0.32	0.46	0.43
TP	0.13	0.49	0.30	0.17	0.09	0.83*	0.26	0.17
NO_3^--N	0.62*	0.73*	0.77*	0.80*	0.82*	0.80*	0.79*	0.82*
NH_4^+-N	0.51	0.63	0.44	0.5	0.57	0.54	0.46	0.53
AP	-0.51	-0.62	-0.46	-0.35	-0.44	-0.35	-0.38	-0.36
DOC	0.75*	0.74*	0.36	0.74*	0.74*	0.73*	0.27	0.76*
DON	-0.19	-0.21	-0.45	-0.23	-0.47	-0.26	-0.33	-0.16
MBC	0.27	0.53	0.54	0.61	0.57	0.60	0.26	0.21
MBN	-0.21	-0.48	-0.46	-0.39	-0.38	-0.58	-0.53	-0.47
pH	0.22	0.09	0.32	0.25	0.17	0.26	0.29	0.22

注：*，**分别表示在 0.05，0.01 水平显著，极显著相关。下同。

Note：*,** are significantly and extremely significantly correlated at 0.05 and 0.01 levels. The same below.

2.6 土壤净 N 硝化速率、净 N 矿化和 N_2O 排放速率与 NFGs、土壤性质的相关分析

由表 3 可见，相关系数表明净氮硝化速率（*Rn*）、净氮矿化率（*Rm*）和 N_2O 排放速率（*Re*）与部分 NFGs 的相对丰度和土壤性质指标密切相关。整体来看，*Rn* 与 *UreC*、*AmoA-AOB*、*nirA*、*nrfA* 的相对丰度以及土壤 SOC、NO_3^--N、MBC、

MBC 含量呈显著正相关，其中 MBC 和 SOC 与 *Rn* 的相关性较强。净氮矿化率（*Rm*）与参与氮循环过程的 NFGs，如 *ureC*、*gdh*、*nifH*、*amoA-AOB*、*narG*、*nirK*、*norB*、*nirA*、*nrfA* 以及土壤 SOC、MBC 含量呈显著正相关，但与 MBC 含量和 *nrfA* 的相关性比与其他因素的相关性更密切。*Re* 与除 *amoAAOA* 和 *hao* 基因无明显相关关系外，与其他所有硝化和反硝化基因相对丰度均呈极显著相关，与土壤 SOC、MBC 含量呈极显著正相关，其中，*amoA-AOB*、*narG* 与 *Re* 更密切。

表 3 氮添加下樟子松人工林土壤净 N 硝化速率、净 N 矿化以及 N_2O 排放速率与 NFGs 相对丰度及土壤因子的关系

Table 3 Relationship between soil net N nitrification rate, net N mineralization rate, N_2O emission rate and relative abundance of NFGs and soil factor under nitrogen addition in Pinus sylvestris var. mongolica plantation

氮转化过程 N transformation process	氨化 Ammonification		固氮 N fixation	硝化 Nitrification			反硝化 Denitrification					同化氮还原 Assimilatory N reduction				异化氮还原 Dissimilatory N reduction		土壤因子 Soil factor							
	ureC	*gdh*	*nifH*	*amoA-AOA*	*amoA-AOB*	*hao*	*narG*	*nirK*	*nirS*	*norB*	*nosZ*	*narB*	*nasA*	*nirA*	*nirB*	napA	nrfA	SOC	TN	NO_3^--N	NO_4^+-N	DOC	DON	MBC	MBN
Rn	0.50*	0.49	0.48	0.21	0.54*	0.36	0.45	0.45	0.41	0.49	0.42	0.27	0.43	0.55*	0.28	0.37	0.55*	0.56*	0.18	0.50*	0.21	-0.06	0.23	0.72*	-0.09
Rm	0.57*	0.57*	0.56*	0.28	0.60*	0.43	0.56*	0.52*	0.49	0.56*	0.49	0.36	0.50	0.61*	0.37	0.45	0.62*	0.56*	0.11	0.40	0.13	-0.02	0.10	0.69*	-0.14
Re	-	-	-	0.28	0.59*	0.39	0.57*	0.53*	0.51*	0.56*	0.52*	-	-	-	-	-	-	0.55*	0.18	0.33	0.18	0.11	0.31	0.57*	0.17

2.7 土壤净氮转化和 N_2O 排放速率与 NFGs、土壤性质的回归分析

由表 4 可见，基于逐步多元回归分析表明，*amoA-AOB* 相对丰度和土壤 MBC 含量是影响净 N 硝化速率（*Rn*）的主导因子，回归分析的决定系数(R^2)值为 0.64（P＜0.001）。*ureC*、*nirK* 相对丰度和土壤 MBC 含量是影响净 N 矿化率（*Rm*）的主导因子，回归分析的 R^2 值为 0.75（P＜0.001）；*narG* 相对丰度和 *nirS* 相对丰度是影响 N_2O 排放速率（*Re*）的主导因子，回归分析的 R^2 值为 0.69（P＜0.001）。

表 4 NFGs、土壤因子与净 N 转化率，净氮矿化率和 N_2O 排放速率的逐步多元回归分析

Table 4 Stepwise multiple regression analysis of NFGs, soil factor and net N nitrification rate, net N mineralization rate and N_2O emission rate

氮转化过程 N Transformation process	方程式 Model	R^2	P
Rn	Y=0.0276*amoA-AOB+0.001*MBC-0.235	0.64	＜0.001
Rm	Y=0.007*ureC-0.002*nirK+0.0005MBC-0.746	0.75	＜0.001
Re	Y=0.0708*narG+0.066*nirS-22.726	0.69	＜0.001

3　讨论

适量的氮（N）添加可以缓解生态系统中的氮素限制，为微生物的生长和基础代谢提供底物和能量，从而激发土壤养分有效性、提高微生物的功能活性(Li et al., 2017)。本研究地点位于塞罕坝人工林场，该区域已被证实氮储备较低(任艳林，2012)，因此 N 添加可能对该区域的养分底物有效性产生影响。本研究中，不同氮水平对不同指标影响不一，随着氮素添加水平的提高，土壤 SOC、MBC、DOC 则呈先上升后下降的趋势，当土壤由于过量添加 N 而使土壤 N 饱和时，土壤养分的分配可能会因此受到影响而降低，即 N 添加水平存在一定阈值。在为期 2 年的试验中，各处理的土壤 pH 为 7.62～7.76，处理间无明显差异，且与 NFGs 的相对丰度没有表现出显著的相关性（表 2），说明本研究中土壤 pH 对 NFGs 影响较弱。这可能是由于土壤具有较高的缓冲能力(江军等，2019)或与其它微生物的共同作用（例如丛枝菌根菌丝作用）的结果(曹本福等，2021)；此外，在 TN、TP、AP、MBN 中各处理亦无明显差异，这可能是因为 2 年的氮添加试验时间较短，不能对其土壤肥力产生全面质变影响的缘故(Ouyang et al., 2016)。

在本研究中，基于 GeoChip 5.0 微阵列系统探索了参与氮转化过程关键基因的相对丰度，结果表明：中低 N 添加处理（N1、N5）对所有 NFGs 皆表现出一定的促进作用，尤其体现在氨化、硝化和反硝化相关基因，而高 N 添加（N10）显著降低了所有 NFGs 的相对丰度。

在氨化循环的相关基因中，N1 和 N5 处理中的 *ureC* 相对丰度显著增加，同时在 N5 处理达到峰值，在 N10 显著下降，且谷氨酰胺合成基因(*gdh*)和厌氧氨氧化基因(*hzsa*)丰度保持不变，这反映了氮素在达到饱和临界状态从而向矿化转化的趋势(Zhang et al., 2019)。此外，本研究发现在 N1 和 N5 处理下的 *nifH* 没有明

显增加，这与早先的研究结果一致，即施氮对 *nifH* 的相对丰度没有影响（Berthrong et al., 2014)。这可能是由于在环境中获得的 N 为有效态(NH_4^+-N、NO_3^--N)因此不需要额外的能量代谢投入(Zheng et al.,2017)。

在参与硝化过程的相关基因中，氮添加处理(N1、N5)显著增加了 *amoA-AOA* 和 *amoA-AOB* 的相对丰度，这与 Szukics(2012)在温带森林中的研究结果趋于一致，这意味着区域气候影响不是主导硝化作用的主要驱动因子。此外，本研究发现硝化过程的总基因丰度与土壤 TN、NO_3^--N 存在显著正相关(表 2)，表明 N 添加引起的土壤 N 含量增加可提高硝化基因的丰度。值得注意的是，在所有处理中 *amoA-AOA* 的丰度皆明显高于 *amoA-AOB*。前人研究表明 *amoA-AOB* 受具有核糖体的功能微生物所介导，因此在营养丰富的环境或适量增加 N 情况下其相对丰度较高。而 *amoA-AOA* 与铵具有较高的亲和力，对氮限制或氮饱和环境具有更好的耐受性(Ouyang et al., 2019)；因此，研究区域中 *amoA-AOA* 在丰度数值上比 *amoA-AOB* 更大，同时 *amoA-AOB* 对 N 的增加反应更敏感，这与农业土壤中的观测结果相似(宋延静等，2020)。

在反硝化的相关功能基因中，N1 和 N5 处理显著增加了 *norB* 的相对丰度，但其他反硝化基因的相对丰度几乎不变，该结果与前人在森林系统中得到的研究结果不同。前人研究表明 *narG*、*nirK* 和 *nirS* 丰度随着 N 添加的增加而大幅度提升，*norB* 和 *nosZ* 对 N 添加不敏感(Tang et al., 2016)。两者研究结果不同的原因可能与反硝化作用的步骤顺序有关，硝酸盐是反硝化的起始底物，其浓度的变化显著影响 *narG* 的表达；随着反硝化的进行，由于植物吸收或 N 发生气态流失使得硝酸盐浓度降低(刘躲等，2020)，因此可能会弱化 N 添加对 *norB* 和 *nosZ* 的影响(Chen et al., 2012)。此外，在本研究中，反硝化基因的相对丰度与 NO_3^--N、DOC 呈显著正相关关系(表 2)，这与前人研究结论：*narG*、*napA* 的相对丰度与 SOC、NO_3^--N 含量呈正相关的结果趋于一致(Wang et al., 2017)。这可能是参与反硝化作用的微生物大多是异养型，因而更多的依赖于有机物。

土壤氮素转化过程主要表现为硝化、矿化和 N_2O 排放，是表征氮素供给及氮损失的重要表征（林伟等，2020）。本研究发现，中、低 N 添加显著提高了净氮硝化速率（*Rn*）、净氮矿化率（*Rm*）和 N_2O 排放速率（*Re*），但在高 N 处理（N10）中上述指标均有所下降。*Rn* 和 *Rm* 是反映土壤无机氮库净变化的直接指标，是有机物质分解、矿化、硝化和固定过程相互作用的重要表现(Chen et al., 2012)。本研究发现 *Rn* 与相关 N 转化过程的核心基因显著相关（表 3）。逐步回归多元分析表明，*amoA-AOB* 的相对丰度和 MBC 含量是影响 *Rn* 的关键因素，且相关性分析表明 *amoA-AOB* 和 *Rn* 之间具有显著的相关关系，因此 *amoA-AOB* 可能是半干旱人工林生态系统中驱动土壤硝化的主要基因(Zhang et al., 2019；Tang et al., 2019)。此外，逐步回归多元分析表明，*ureC*、*nirK* 丰度和 MBC 含量是影响 *Rm* 的重要参数，表明 *Rm* 与有机氮矿化和反硝化过程密切相关。同理，*Re* 与参与硝化和反硝化过程的 NFGs 显著相关（表 3），*Re* 与反硝化途径基因

narG 和 *nirS* 密切相关，表明反硝化是温带森林土壤中 N_2O 释放的主要途径，而 *narG*、*nirS* 与 *Re* 显著正相关，这意味着 *nirS* 丰度可作为估算 Re 排放的有效参数(Flaa et al., 2019)。

4 结论

本研究表明，中、低氮添加水平（1、5 g N m^{-2} •$year^{-1}$）对氮功能基因（NFGs）的总相对丰度没有显著影响，但增加了氨化、硝化和反硝化等特定基因的相对丰度。高 N 添加处理（N10）中，所有氮转化过程的 NFGs 相对丰度皆显著降低。这些影响主要与土壤 C、N 养分指标（SOC、NO_3^--N、DON）的变化有关，而与 pH 无关。相关分析表明，上述促进作用与土壤 SOC、NO_3^--N 和 MBC 显著相关。N10 处理显著降低了所有氮转化过程 NFGs 的相对丰度，这种负面影响与 DOC、MBC 含量的减少有关。与氮转化基因丰度规律趋势相似，N1 和 N5 处理显著增加了净 N 硝化、净 N 矿化以及 N_2O 的排放速率，但 N10 促进作用不明显，表明氮添加对氮转化的促进作用存在阈值。此外，逐步多元回归分析表明，*amoA-AOB* 的相对丰度和 MBC 含量可作为净 N 硝化率的关键预测指标；*ureC*、*nirK* 的相对丰度与 MBC 含量可作为净氮矿化率的关键预测指标；而 *narG*、*nirS* 的相对丰度可作为 N_2O 排放速率的关键预测指标。研究结果为樟子松人工林的氮肥管理提供了理论依据。

参考文献

BAO SD, 2000. Soil Agrochemical Analysis[M]. Beijing: China Agriculture Press. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京：中国农业出版社，2000.]

CAO BF, JIANG HX, LIU L, et al., 2021. Research progress on mechanism of arbuscular common mycorrhizal networks in plant-plant interactions[J]. J Appl Ecol, 32(9):3385-3396. [曹本福，姜海霞，刘丽，等，2021. 丛枝菌根菌丝网络在植物互作中的作用机制研究进展[J]. 应用生态学报，32(9)：3385-3396.]

CHEN Z, LIU JB, WU MN, et al., 2012. Differentiated response of denitrifying communities to fertilization regime in paddy soil[J]. Microbiol Ecol, 63(2):446–459

CHELSEA JC, NICHOLAS CD, MICHAEL BJ, et al., 2016. Meta-analysis reveals ammonia-oxidizing bacteria respond more strongly to nitrogen addition than ammonia-oxidizing archaea[J]. Soil Biol Biochem, 99:158-166.

FLAA B, AAMC A, AF A, et al., 2019. Different groups of nitrite-reducers and N_2O-reducers have distinct ecological niches and functional roles in West African cultivated soils - Science Direct[J]. Soil Biol Biochem, 129:39-47.

JU XT, 2014. The concept and significance of nitrogenous fertilizer efficiency—concurrently discussing the misunderstanding of traditional nitrogenous fertilizer use efficiency[J]. J Soil, 51(5):921-933. [巨晓棠，2014. 氮肥有效率的概念及意义—兼论对传统氮肥利用率的理

解误区[J]. 土壤学报，51(5):921-933.]

JIANG J, CAO NN, YU MX, et al., 2019. A review of the key mechanisms of acidic forest soils to buffer acid deposition[J]. J Trop Subtrop Bot, 27(5):491-499. [江军，曹楠楠，俞梦笑，等，2019. 酸性森林土壤缓冲酸沉降关键机理研究进展[J]. 热带亚热带植物学报，27(5):491-499.]

JI HK, WU YY, FU PJ, et al., 2020. Composition and size distribution characteristics of soil dissolved organic nitrogen under different land use types in tropical coastal areas[J]. J Ecol Environ, 29(3):525-535. [吉恒宽，吴月颖，符佩娇，等，2020.热带滨海区不同土地利用背景下土壤溶解性有机氮的组成与粒径分布特征[J]. 生态环境学报，29(3):525-535.]

JING H, ZHANG P, LI J, et al., 2019. Effect of nitrogen addition on the decomposition and release of compounds from fine roots with different diameters: the importance of initial substrate chemistry[J]. Plant Soil, 438(1/2):281-296.

LIN W, LI YZ, LI YJ, et al., 2020. Advances in the mechanism of microbe-driven nitrogen cycling[J]. J Plant Nutr Fert, 26(6):1146-1155. [林伟，李玉中，李昱佳，等，2020. 氮循环过程的微生物驱动机制研究进展[J]. 植物营养与肥料学报，26(6):1146-1155.]

LIAO K, SHEN FF, LIU WF, et al., 2020. C， N and P stoichiometric characteristics of litterfall and soil in a Chinese fir plantation under long-term nitrogen deposition[J]. Gguihaia, 40(11):1551-1562. [廖珂，沈芳芳，刘文飞，等，2020.长期氮沉降下杉木人工林凋落物与土壤的 C、N、P 化学计量特征[J].广西植物，40(11):1551-1562.]

LIAO LR, WANG J,ZHANG C, et al., 2019. Effects of grazing exclusion on the abundance of functional genes involved in soil nitrogen cycling and nitrogen storage in semiarid grassland[J]. J Appl Ecol, 30(10):3473-3481. [廖李容，王杰，张超，等，2019. 禁牧对半干旱草地土壤氮循环功能基因丰度和氮储量的影响[J]. 应用生态学报，30(10):3473-3481.]

LIU D, WANG L, CAO ZB, et al., 2020. Effects of mycorrhizal fungi on nitrification and denitrification in the rhizospheric soil of aquatic plants and its microbial mechanism[J]. Environ Sci, 41(2):932-940. [刘躲，王磊，曹湛波，等，2020. 接种菌根真菌对湿生植物根际土壤硝化反硝化活性的影响及其微生物机制[J]. 环境科学，41(2):932-940.]

LI HX, XIN YJ, LI ZH, et al., 2021. Effects of different nitrate form on the growth and physiological characteristics for quercus mongolica seedlings[J]. For Eng, 37(2):35-40. [李海霞，邢亚娟，李正华，等，2021.不同氮素形态对蒙古栎幼苗生长及生理特性的影响[J]. 森林工程，37(2):35-40.]

LI H, YANG S, XU ZW, et al., 2017. Responses of soil microbial functional genes to global changes are indirectly influenced by aboveground plant biomass variation[J]. Soil Biol Biochem, 104: 18-29.

LU H, ZHAO Y, SHENG YY, et al., 2018. Research on soil microbial functional genes in alpine meadow based on GeoChip technique[J]. J Ecol, 37(10):3031-3037. [卢慧，赵珩，盛玉钰，

等，2018. 基于功能基因芯片技术的高寒草甸土壤微生物功能基因研究[J]. 生态学杂志，37(10):3031-3037.]

MA F, MA HL, QIU H, et al., 2015. Effects of water levels and the additions of different nitrogen forms on soil net nitrogen transformation rate and N_2O emission in subtropical forest soils[J]. J Appl Ecol, 26(2):379-387. [马芬，马红亮，邱泓，等，2015.水分状况与不同形态氮添加对亚热带森林土壤氮素净转化速率及 N_2O 排放的影响[J]. 应用生态学报，26(2):379-387.]

OUYANG Y, EVANS SE, FRIESEN ML, et al., 2018. Effect of nitrogen fertilization on the abundance of nitrogen cycling genes in agricultural soils: a meta-analysis of field studies[J]. Soil Biol Biochem, 127:71-78.

OUYANG Y, NORTON J M, STARK J M, et al., 2016. Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil[J]. Soil Biol Biochem, 96:4-15.

REN YL, 2012. Effects of Precipitation Change on Inorganic Nitrogen and Net Nitrogen Mineralization Rate at a Plantation of Mongolian Pine[J]. J Peiking Univ(Nat Sci Ed), 48(6):925-932. [任艳林，2012. 降水变化对樟子松人工林土壤无机氮和净氮矿化速率的影响[J]. 北京大学学报(自然科学版)，48(6):925-932.]

SZUKICS U, HACKL E, ZECHMERISTER BS, et al., 2012. Rapid and dissimilar response of ammonia oxidizing archaea and bacteria to nitrogen and water amendment in two temperate forest soils[J]. Microbiol Res, 167(2):103-109.

TIAN J, DUNGAIT JAJ, LU XK, et al., 2019. Long-term nitrogen addition modifies microbial composition and functions for slow carbon cycling and increased sequestration in tropical forest soil[J]. Glob Chage Biol, 25(10):3267-3281.

TANG YQ, YU GR, ZHANG XY, et al., 2019. Environmental variables better explain changes in potential nitrification and denitrification activities than microbial properties in fertilized forest soils[J]. Sci Total Envir, 647: 653-662.

TANG YQ, ZHANG XY, LI DD, et al., 2016. Impacts of nitrogen and phosphorus additions on the abundance and community structure of ammonia oxidizers and denitrifying bacteria in Chinese fir plantations[J]. Soil Biol Biochem, 103: 284-293.

SONG YJ, MA L, LI M, et al., 2020. Spatial Distribution of ammonia oxidizers in rhizosphere soil of *Phragmites australis* in the Yellow River Delta[J]. J Shandong Agr Sci, 52(10):144-150. [宋延静，马兰，李萌，等，2020. 黄河三角洲芦苇根际氨氧化微生物的空间分布[J]. 山东农业科学，52(10):144-150.]

WU YF, GAO XP, GUI DW, et al., 2019. Research progress on the monitoring methods of atmospheric nitrogen deposition[J]. J Appl Ecol, 30(10):3605-3614. [吴玉凤，高霄鹏，桂东伟，等，2019. 大气氮沉降监测方法研究进展[J]. 应用生态学报，30(10):3605-3614.]

WANG ZL, LIU CX, JIANG QX, et al., 2021. Effects of climate warming on the key process and

index of black soil carbon and nitrogen cycle during freezing period[J]. Environ Sci, 42(4):1967-1978. [王子龙，刘传兴，姜秋香，等，2021.气候变暖对冻结期黑土碳氮循环关键过程及指标的影响[J]. 环境科学，42(4):1967-1978.]

WANG H, NA D, WU D, et al., 2017. Long-term net transformation and quantitative molecular mechanisms of soil nitrogen during natural vegetation recovery of abandoned farmland on the Loess Plateau of China[J]. Sci Total Envir, 607/608(31):152-159.

ZHANG YG, LIU X, CONG J, et al., 2017. The microbially mediated soil organic carbon loss under degenerative succession in an alpine meadow[J]. Mol Ecol, 26(14): 3676-3686.

ZHANG C, SONG ZL, ZHUANG DH, et al., 2019 Urea fertilization decreases soil bacterial diversity, but improves microbial biomass, respiration, and N-cycling potential in a semiarid grassland[J]. Biol Fert Soils, 55(3): 229–242.

ZHANG M, WANG W, WANG D, et al., 2018. Short-term responses of soil nitrogen mineralization, nitrification and denitrification to prescribed burning in a suburban forest ecosystem of subtropical Australia[J]. Sci Total Environ, 642(15):879-886.

ZHENG M, WEI Z, LUO Y, et al., 2017. Different responses of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen addition between disturbed and rehabilitated subtropical forests[J]. Sci Total Environ, 601/602:1505-1512.